

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
11 **DE 3635013 A1**

51 Int. Cl. 4:  
G01N 1/28 G

21 Aktenzeichen: P 36 35 013.3  
22 Anmeldetag: 15. 10. 86  
43 Offenlegungstag: 11. 5. 88

DE 3635013 A1

71 Anmelder:  
Graskötter, Karl-Rainer, 4630 Bochum, DE

74 Vertreter:  
Betzler, E., Dipl.-Phys., 8000 München;  
Herrmann-Trentepohl, W., Dipl.-Ing., 4690 Herne;  
Bockhorni, J., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000  
München

72 Erfinder:  
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 **Vorrichtung zur Untersuchung von in vitro gehaltenen Gewebeproben**

Bei einer Vorrichtung zur Untersuchung von in vitro gehaltenen Gewebepreparaten mit mindestens einer Kammer zur Aufnahme des Präparats, die mit dem jeweiligen Untersuchungsreagenz füllbar und von einem transparenten Deckel verschließbar ist, der mit Hilfe einer Klemmvorrichtung die Kammer dicht abschließt, ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß die Tiefe der Kammer in etwa in der Größenordnung der Präparatsdicke liegt und im Boden der Kammer eine Einfüllöffnung vorgesehen ist, daß die Kammer mit Auslaßöffnungen verbunden ist, an die Rohrleitungen angeschlossen sind, wobei an wenigstens eine ein Unterdruck anlegbar ist.

z.B.:

Türkenball

DE 3635013 A1

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Untersuchung von in vitro gehaltenen Gewebepreparaten, mit mindestens einer Kammer zur Aufnahme des Präparates, die mit dem jeweiligen Untersuchungsreagenz füllbar und von einem transparenten Deckel verschließbar ist, der mit Hilfe einer Klemmvorrichtung die Kammer dicht abschließt, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Tiefe der Kammer (6) in etwa in der Größenordnung der Präparatsdicke liegt und im Boden der Kammer (6) eine Einfüllöffnung (5') vorgesehen ist, daß die Kammer (6) mit Auslaßöffnungen (5) verbunden ist, an die Rohrleitungen (13) angeschlossen sind, wobei an wenigstens eine ein Unterdruck anlegbar ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Deckel der Kammer (6) der das Präparat tragende Objektträger ausgebildet ist.
3. Vorrichtung nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Boden der Kammer (6) insbesondere im Bereich der Einfüll- und Ablassöffnungen (5, 5') längs- und querverlaufende Vertiefungen aufweist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammer (6) aus transparentem Material besteht.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammer (6) in einem verwindungssteifen Gestell (2) insbesondere aus Metall angeordnet ist, derart, daß die Einfüllöffnung (5') unterhalb der Auslaßöffnungen (5) zu liegen kommt.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Auslaßöffnungen (5) über die Rohrleitungen (13) mit einem Sammelbehälter (7) verbunden sind.
7. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Einfüll- und der Absaugvorgang mittels einer elektromagnetischen Steuerung automatisierbar ist.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß zum Einfüllen der Reagenzien ein rechnergesteuerter Manipulator (21) vorgesehen ist, der eine Pipette trägt.
9. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vielzahl von Kammern (6) in einem verwindungssteifen Gestell (2) angeordnet ist.
10. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß in der Einfüllöffnung (5') ein Schlauch mündet, dessen der Einfüllöffnung (5') entgegengesetztes Ende trichterförmig ausgebildet ist.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Auslaßöffnungen (5') jeder Kammer (6) über die Rohrleitungen (13) mit einem gemeinsamen Sammelbehälter (7) verbunden sind.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Auslaßöffnungen (5') jeder Kammer (6) mit einem dieser zugeordneten Sammelbehälter (7) verbunden sind.
13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sammelbehälter (7) austauschbare Reagenzgläser sind.
14. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13 gekennzeichnet durch die Verwen-

dung von hitzebeständigem Material, insbesondere Metall, Glas und Silikon-Kautschuk als Klebstoff.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Untersuchung von in vitro gehaltenen Gewebeproben gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Insbesondere handelt es sich dabei um eine Inkubationseinrichtung für bereits auf Objektträger aufgezogene histologische Schnitte, Zellausstriche, Zellkulturen und ähnliches.

Bei diesen Untersuchungen, bei denen die Präparate eingefärbt werden oder histochemische und immunhistochemische Reaktionen erforscht werden, werden die auf Objektträger aufgezogenen Präparate in Bäder von z. B. Xylol oder Alkohol eingehängt, wobei Xylol zur Lösung des z. B. im Gewebeschnitt noch vorhandenen Paraffins dient und Alkohol, um den Schnitt zu rehydrieren. Bei oben genannten Untersuchungen werden weiter Reagenzien benötigt, die sehr teuer und wenig haltbar sind. Daher wird schon seit langem nach Methoden gesucht, den Reagenzienbedarf in engen Grenzen zu halten. Man geht dabei so weit, daß histologische Schnitte und sonstige Gewebe und Zellen flach auf dem Objektträger liegend mit Reagenzien beträufelt und bei Beendigung der Untersuchung abgeschüttet werden. Dabei geschieht es häufig, daß der Schnitt gelöst wird und abschwimmt. Eine Temperaturkonstanz ist kaum einzuhalten. Ein Trockenlegen des Gewebes ist unbedingt zu verhindern. Es sind daher im Stand der Technik schon sogenannte "feuchte Kammern" vorgeschlagen worden. Weitere Veröffentlichungen, z. B. von Bartonicek V., Lojda Z. (1963) "Incubation Chambers made of Plastic", Acta histochem 15, S. 389 bis 391 und Ormanns W., Pfeifer U. (1981) "A Simple Method for Incubation of Tissue Sections in Immunohistochemistry", Histochemistry 72, S. 315 bis 319 schlagen andere Versuchsaufbauten vor. So wird bei Ormanns die Kammer aus zwei mit geringem Abstand zueinander angeordneten Objektträgern gebildet, zwischen denen sich das Präparat in der Flüssigkeit befindet. Dabei wird die Flüssigkeit lediglich durch ihre Oberflächenspannung zwischen den Objektträgern gehalten. Ein Abschwimmen des Präparates ist nicht ausgeschlossen. Darüberhinaus ist der Aufbau dieser Vorrichtung für große Versuchsreihen nicht geeignet. Daher haben sich derartige Kammern allgemein nicht durchsetzen können. Immunhistorische Verfahren sind mühsam und zeitaufwendig und darüberhinaus für den Durchführenden sehr langweilig, obwohl sorgfältiges Arbeiten vorauszusetzen ist.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung der eingangs genannten Art so auszubilden, daß auch bei großen Versuchsreihen stets die gleichen Bedingungen erfüllt sind, daß insbesondere ein Abschwimmen der Präparate vermieden wird, wobei mit geringen Flüssigkeitsmengen gearbeitet werden kann.

Diese Aufgabe löst die Erfindung mit den Merkmalen des kennzeichnenden Teils des Anspruchs 1. Weitere vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Durch besondere Ausgestaltung der Kammer ist das Abschwimmen des Präparates ausgeschlossen, da die Tiefe der Kammer lediglich etwa 50 µm beträgt, so daß, selbst wenn sich das Präparat vom Objektträger löst, dieses zwischen Objektträger und Kammerboden eingeklemmt bleibt. Die geringen Kammerabmessungen führen dazu, daß nur geringe Mengen an Flüssigkeit

benötigt werden, die z. B. mit Hilfe einer Pipette über die Einfüllöffnung frisch in die Kammer eingebracht wird. Nach Ende der Untersuchung wird die verbrauchte Flüssigkeit mit samt den darin gelösten Gewebestandteilen über die Auslaßöffnungen abgezogen. Das Abziehen der verbrauchten Flüssigkeit geschieht dabei mit Hilfe eines an die Auslaßöffnungen angelegten geringen Unterdrucks, so daß ein Bewegen der Kammer überflüssig ist. Die Herstellung der Kammer erfolgt z. B. durch Ätzen oder Einschleifen einer Vertiefung in eine dünne Glasplatte.

Als Deckel der Kammer dient vorzugsweise der das Präparat tragende Objektträger, was eine schonende Behandlung des Präparats mit sich bringt, welches somit nicht mühsam in die Kammer eingebracht werden muß. Der vorbereitete und auf dem Objektträger haftende Gewebeschnitt verschließt mit samt dem Objektträger die obere Kammeröffnung. Danach braucht der Laborant lediglich die Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipette in die Kammer einzubringen.

Damit sich die Flüssigkeit nach dem Einbringen in die Kammer gleichmäßig verteilt, sind gemäß dem Vorschlag des Anspruchs 3 in den Boden der Kammer, insbesondere im Bereich der Einfüll- und Ablaßöffnungen längs und querverlaufende Vertiefungen eingearbeitet. Diese Vertiefungen lenken den Flüssigkeitsstrom so, daß querverlaufende Vertiefungen eine bessere Verteilung, längsverlaufende Rillen einen gerichteten gleichmäßigen Verlauf bewirken.

Zur besseren Beobachtung der Präparate ist gemäß Anspruch 4 vorgeschlagen, daß die Kammer aus transparentem Material besteht. Das kann geeigneter Kunststoff sein, ist jedoch in der Regel Glas.

Die Merkmale des Anspruchs 5 sehen vor, daß die Kammer in einem verwindungssteifen Gestell, insbesondere aus Metall angeordnet ist, derart, daß die Einfüllöffnung unterhalb der Auslaßöffnung zu liegen kommt. Durch diese Anordnung, bei der die Kammer schräg von unten nach oben langsam gefüllt werden kann, wird ein möglichst blasenfreies Inkubationsbad erzielt. Außerdem gewährleistet die stabile Gestellkonstruktion konstante räumliche Bedingungen, da Verwindungen und Erschütterungen weitgehend ausgeschlossen sind.

Wenn gemäß Anspruch 6 die Auslaßöffnungen über Rohrleitungen mit einem Sammelbehälter verbunden sind, ist es möglich, die verbrauchte Flüssigkeit in diesem Sammelbehälter aufzufangen, wonach sie entweder weiteren Untersuchungen zugeführt oder aber auf einfache Weise entsorgt werden kann.

Zur weiteren Entlastung des Bedienungspersonals kann gemäß Anspruch 7 vorgesehen sein, daß der Einfüll- und der Absaugvorgang mittels einer elektromagnetischen Steuerung automatisierbar ist. So kann die Zufuhr der Flüssigkeit über ein elektromagnetisches Ventil erfolgen, ebenso wie das Absaugen der verbrauchten Flüssigkeit. Zu- und Abfuhr der Flüssigkeit kann dabei z. B. über einen Rechner gesteuert werden.

Dabei ist es gemäß Anspruch 8 möglich, zum Einfüllen der Reagenzien einen rechnergesteuerten Manipulator vorzusehen, der eine Pipette trägt.

Das ist insbesondere dann von Vorteil, wenn nicht nur eine Kammer sondern eine Vielzahl nebeneinander angeordneter Kammern vorhanden ist, die alle in einem verbindungssteifen Gestell angeordnet sind. Die einzelnen Kammern bilden dabei eine Matrix. Der Rechner ist so programmiert, daß er z. B. einen X-Y-Schreiber, dessen Tintenspitze durch eine Pipette ersetzt ist, so steu-

ert, daß er nacheinander die einzelnen Matrixelemente anfährt, die Spitze der Pipette in die Einfüllöffnung einführt und die Flüssigkeit über das elektromagnetische Ventil freigibt. Zum sicheren Einführen der Flüssigkeit in die Einfüllöffnung schlägt der Anspruch 10 vor, daß in der Einfüllöffnung ein Schlauch mündet, dessen der Einfüllöffnung entgegengesetztes Ende trichterförmig ausgebildet ist. Das hat den weiteren Vorteil, daß ein Trockenfallen der Kammern während der Untersuchung ausgeschlossen ist, da in dem Schlauch Flüssigkeit ansteht, die aufgrund des angelegten geringen Unterdrucks bei Flüssigkeitsverlust in der Kammer nachströmen kann.

Anspruch 11 sieht vor, daß alle Kammern über die Rohrleitungen mit einem einzigen Sammelbehälter verbunden sind. Ist dieser Sammelbehälter gefüllt, kann er aus dem Gestell entnommen werden und so die verbrauchte Flüssigkeit entsorgt werden. Es ist jedoch auch möglich, daß jede Kammer mit einem separaten Sammelbehälter verbunden ist. Auf diese Weise kann die verbrauchte Flüssigkeit, die nur die Reste eines einzigen Präparats beinhaltet, weiteren Untersuchungen zugeführt werden. Zu denken ist etwa an die Messung des Stoffumsatzes oder des Glukoseverbrauchs, was darüber Auskunft gibt, ob das Gewebe noch vital ist.

Zweckmäßigerweise sind die Sammelbehälter austauschbare Reagenzgläser, wie es der Anspruch 13 vorschlägt.

Damit die gesamte Vorrichtung sterilisierbar ist, ist sie zweckmäßigerweise aus hitzebeständigem Material gebaut, insbesondere am Metall, Glas und Silikon-Kautschuk als Kleber.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Zeichnungen dargestellt und näher erläutert. Es zeigen

Fig. 1 Draufsicht auf die Unterseite der Vorrichtung (Ausschnitt);

Fig. 2 Draufsicht auf die Vorderseite der Vorrichtung (abgebrochene und teilweise aufgeschnittene Darstellung);

Fig. 3 Schnitt durch die Vorrichtung in Höhe des Pfeils Pin Fig. 2;

Fig. 4 möglicher Aufbau einer automatisierten Vorrichtung;

Fig. 5 möglicher Aufbau insbesondere für Großlabors.

In der Zeichnung ist die erfindungsgemäße Vorrichtung allgemein mit dem Bezugszeichen (1) versehen. Die Vorrichtung besteht aus einem verwindungssteifen Rahmen, insbesondere aus Metall, in den rechteckförmige Öffnungen (2) eingelassen sind. Zwischen den Öffnungen sind Metallstreifen (3) befestigt, die als Abstandhalter dienen. Auf jedem zweiten Abstandhalter (3) sind Schrauben (4) angeordnet, die zur Befestigung eines nicht dargestellten Andrückmechanismus dienen. Schräg oberhalb der Öffnungen (2) ist auf jeder Seite eine Auslaßöffnung (5) angebracht. Auf die Öffnungen (2) werden die mit den Kammern versehenen Glasplatten (6) gelegt. Im Kammerboden befindet sich eine Einlaßöffnung (5'). Der untere Teil der Vorrichtung wird im wesentlichen von einem Sammelbehälter (7) gebildet, der gemäß Fig. 2 über Schläuche (13) mit den Auslaßöffnungen (5) in Verbindung steht. Die Kammer (7) ist seitlich durch Wände (8) abgeschlossen. Mit Hilfe der Schrauben (9) kann ein Deckel auf dem Behälter (7) befestigt werden. In der Kammer (7) wird mit Hilfe von Rohren (10) ein Unterdruck erzeugt, der in der Größenordnung von ungefähr fünf Millibar liegt und über die Schläuche (13) und die Auslaßöffnung (5) in die Kam-

mern (6) wirkt. Durch die Wand (11) wird die Kammer auch nach unten dicht abgeschlossen. Über den verschließbaren Stutzen (12) werden die verbrauchten Reagenzien entfernt. Es ist jedoch auch möglich, einen aus- und einbaubaren Behälter (7) vorzusehen. Es ist weiterhin möglich, den Behälter (7) durch Zwischenwände (17) weiter zu unterteilen, wie es in der Fig. 2 angedeutet ist. Jede Kammer (6) steht dann mit einem separaten Behälter über die Schläuche (13) in Verbindung, so daß die darin aufgefangenen verbrauchten Reagenzien einer weiteren Untersuchung zugeführt werden können. Die die Kammern (6) enthaltenen Einsätze sind entweder aus Glas oder klarem chemikalienbeständigem Kunststoff angefertigt, wobei die Kammer eine Abmessung von  $2 \times 2,5$  cm und eine Tiefe von ca. 50 Mikrometer aufweist. Die Einfüllöffnung (5') ist nach außen hin mit einem Trichter (nicht dargestellt) versehen. Ein nicht dargestellter federnder Andrückmechanismus verteilt die Kräfte etwa gleichmäßig auf die als Deckel der Kammern (6) dienenden Objektträger. Zur Stabilisierung des verwindungssteifen Rahmens sind stabile Metalleisten (15) vorgesehen, an die Metallblech (16) angelötet ist.

Für die Routinediagnostik werden in der Regel keine größeren Kapazitäten benötigt. Hier werden wie in Fig. 4 dargestellt z. B. drei Rahmen mit zusammen etwa dreißig Inkubationskammern vorgeschlagen. Die Steuerung kann, falls ein Pipettieren und Absaugen per Hand nicht erwünscht ist, mit einem Mikrocomputer (19), evtl. mit Drucker zur genauen Dokumentation (20) und Pipette (21) z. B. auf einem modifizierten X-Y-Schreiber erfolgen. Die Reagenzien (22) werden jeweils vorher zugegeben. Die Abb. 5 zeigt eine erweiterte Ausführung. Wegen der größeren Menge der teuren Chemikalien sind Vorkehrungen zur Pufferung des Betriebsanlaufes bei Netzausfall bezüglich Stromversorgung und Wärme vorgesehen. Bei Betrieb ober- oder unterhalb der Raumtemperatur ist eine Abdeckung (23) anzubringen, so daß die Konstanthaltung der Temperatur möglich ist.

Die Vorrichtung arbeitet wie folgt: Über die Einfüllöffnung (5') wird die Flüssigkeit in die Kammer (6) eingebracht, in der sich auf der Unterseite des Objektträgers, der als Deckel der Kammer dient, haftend das zu untersuchende Präparat befindet. Durch die geringe Tiefe der Kammer (6) ist gewährleistet, daß ein Abschwimmen des Präparates vermieden wird. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit mit Hilfe des Unterdrucks über die Auslaßöffnungen (5) und die Schläuche (13) in den Behälter (7) abgesaugt. Aus diesem Behälter (7) wird die verbrauchte Flüssigkeit abgeführt und entsorgt. Sind die Kammern (6) mit separaten Behältern (7) versehen, so können die verbrauchten Reagenzien einer weiteren Untersuchung zugeführt werden. Dabei werden vorteilhafterweise die Behälter (7) von auswechselbaren Reagenzgläsern gebildet, was die weitere Untersuchung erleichtert.

- Leerseite -

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

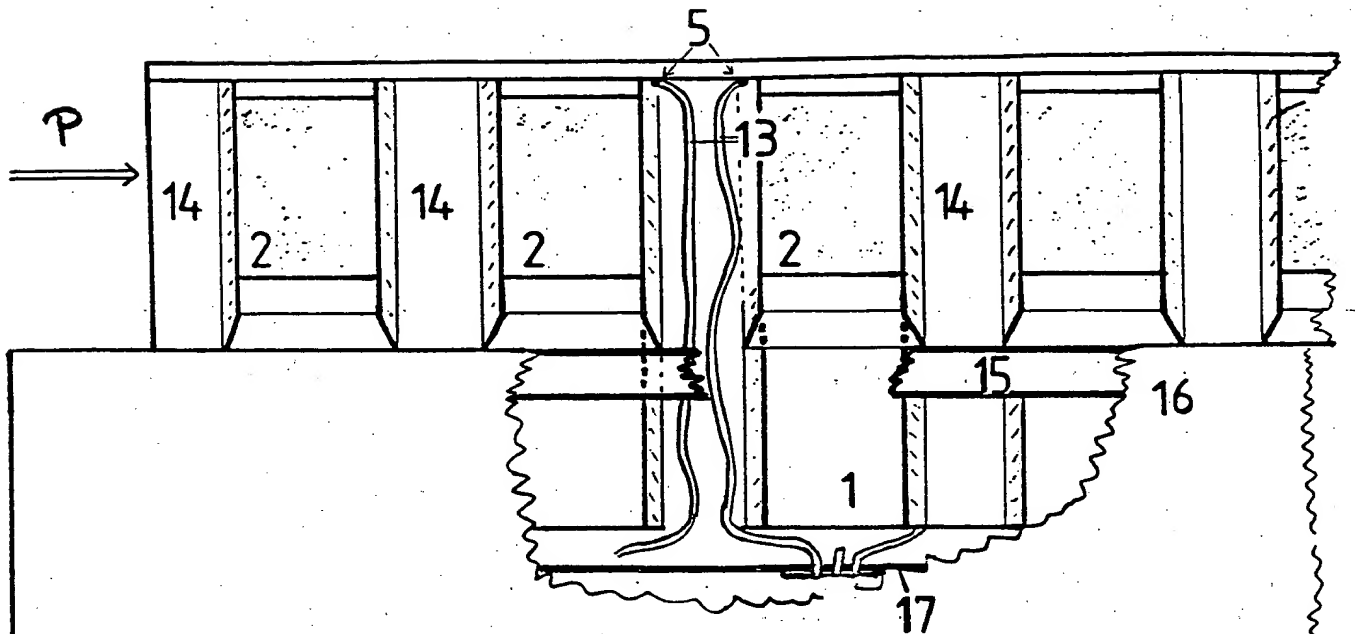


ABB. 2  
(Vorderseite)

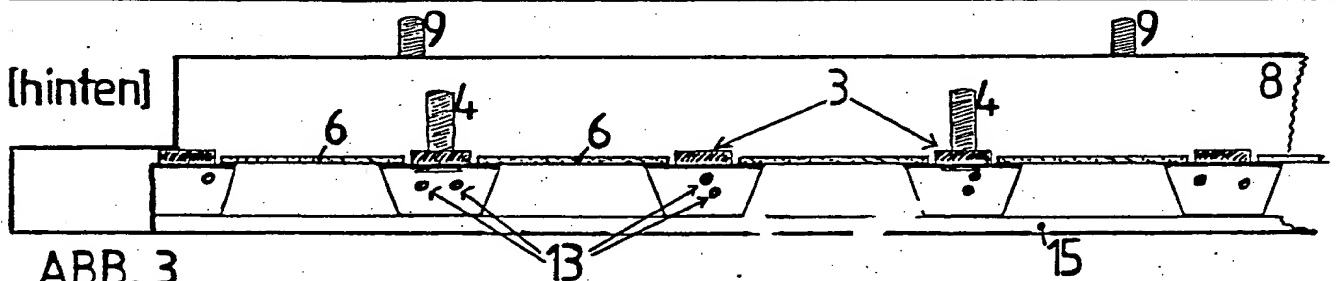


ABB. 3  
(Aufsicht ab Pfeil in Abb. 2)

0 1 2 3 4 5 10 cm

3635013

1+

ABB. 4

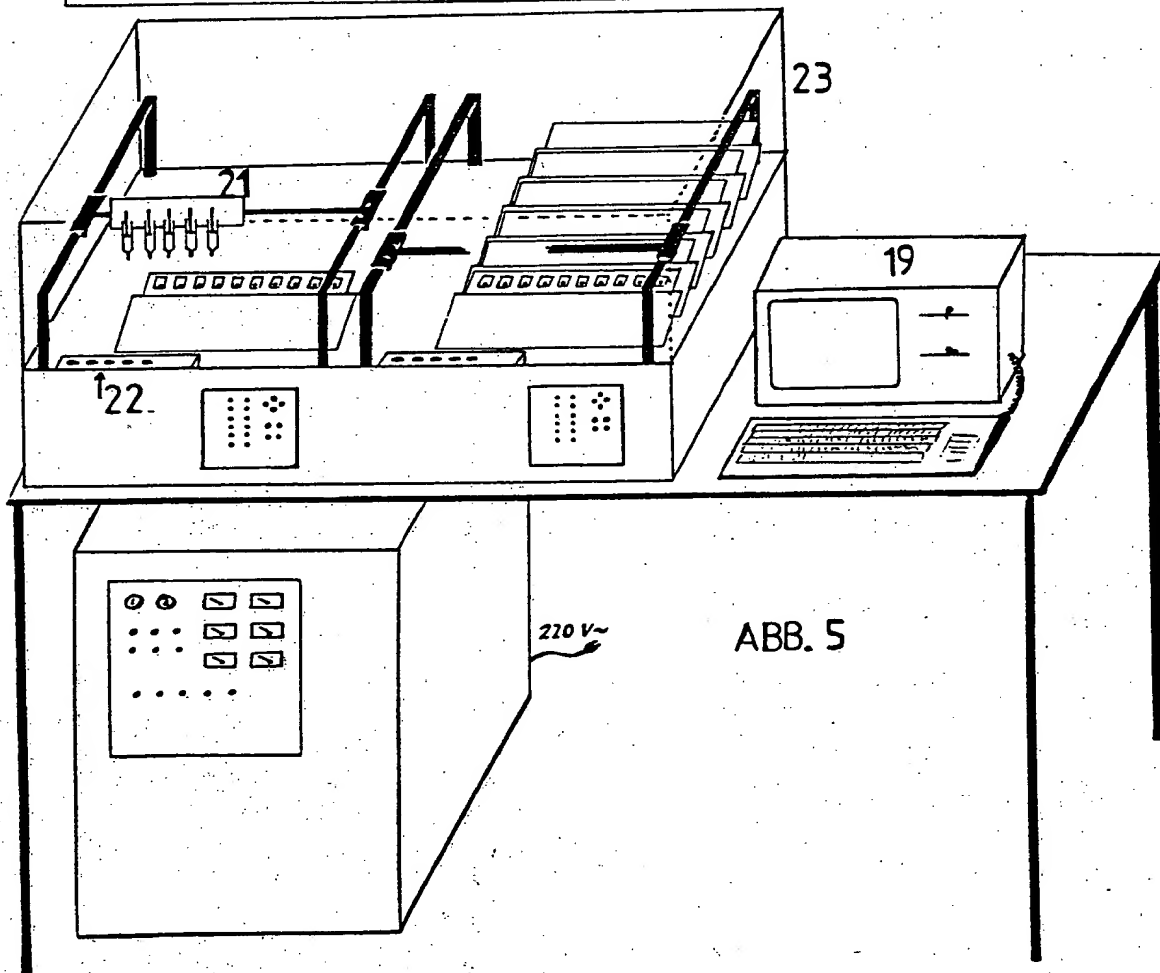
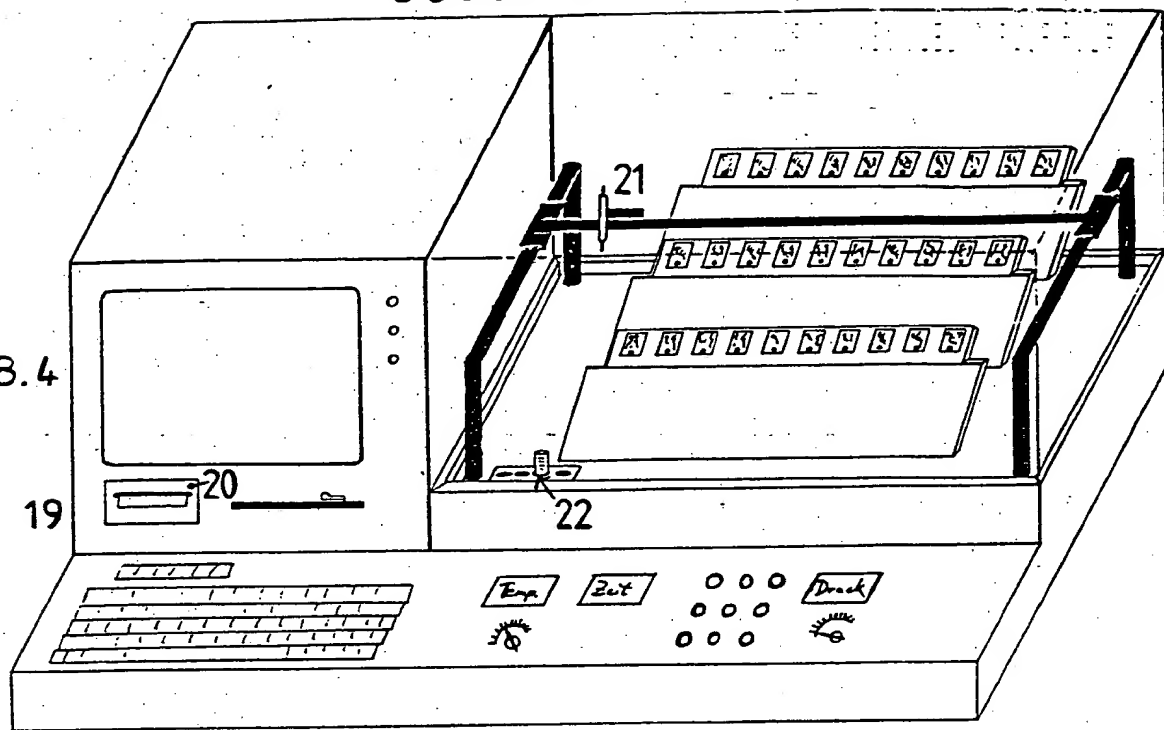


ABB. 5



**36 35 013**

**G 01 N 1/28**

15. Oktober 1986

11. Mai 1988

Fig. : 15 : 11

Technical drawing of a mechanical assembly, labeled ABB. 1 (Rückseite). The drawing shows a cross-section of a device with various components numbered 1 through 12. A hatched area is labeled 7. A section line is indicated by 5-5'. A scale bar at the bottom right shows a length of 10 cm, with markings from 0 to 5 cm. The drawing is oriented vertically, with the top of the device at the bottom of the page.

ABB. 1  
(Rückseite)